

ความก้าวหน้าในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองในประเทศไทย

Advance in Tissue Culture for Soybean Improvement in Thailand

สิรินุช ลามศรีจันทร์¹ พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์² กุลวดี ไชยประสิทธิ์²
ฉันทนา คงนคร² พีรณัฐ การวิธ² และ ศศิธร เชื้อกฤษณะ³

Siranut Lamseejan, Peerasak Srinives, Gulvadee Chaiyaprasithi,
Chuntana Kongnakhon, Peeranuch Kareeros and Sasithorn Chuakuna

ABSTRACT

Soybean tissue culture protocols in Thailand are set up by 2 laboratories of Kasetsart University, one in the Department of Applied Radiation and Isotopes, Faculty of Science, and the other in the Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, They have developed methods, viz. (1) multiple shoot induction from zyotic embryo (2) somatic embryogenesis from immature cotyledon (3) embryogenic suspension culture, and (4) embryo rescue. Each method can be applied to suit various aspects of soybean improvement in Thailand. Method (1) is employed mainly for propagation purpose. Since the plantlets are not derived through callus, they are true-to-type. Method (2) is utilized to induce and select for mutants developed through somatic embryogenesis. Method (3) is more preferable than method (2) since it enhances contact between embryoids and the selection pressure applied into the medium. This helps selecting the real mutants rather than the escape ones. Method (4) allows a plant breeder to expand the use of soybean germplasm, especially to rescue the embryo from wide crossing, before pod abortion.

Key word : soybean tissue culture, zygotie embryo, somatic embryogenesis, embryonic suspension culture, embryo rescue.

1 ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Dept. of Applied Radiation and Isotopes, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

2 ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Dept of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

3 วิทยาลัยเกษตรกรรมนครพนม อ.เมือง จ.นครพนม

Nokhon Phanom Agricultural College, Muang District, Nakhon Phanom, Thailand.

บทคัดย่อ

งานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วเหลืองในประเทศไทย ดำเนินการสำเร็จเป็นที่น่าพอใจ โดยเฉพาะห้องปฏิบัติการวิจัยของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ กับที่ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร สามารถหาวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วเหลืองได้ 4 วิธี คือ (1) การชักนำให้เกิดยอดหลายยอดโดยการเพาะเลี้ยงกัพพะ (2) การชักนำให้เกิดต้นโดยการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงอ่อน (3) การชักนำให้เกิดต้นและการเลี้ยงโซมาติกอีมบริโอ ในอาหารเหลว และ (4) การช่วยชีวิตกัพพะ แต่ละวิธีที่กล่าวถึง สามารถนำมาประยุกต์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองในประเทศไทยได้ต่างกัน กล่าวคือ วิธีที่ (1) มีประโยชน์เพื่อการขยายพันธุ์เพิ่มจำนวนต้นที่ตรงตามพันธุ์ เนื่องจากต้นอ่อนไม่ได้พัฒนาจากแคลลัส วิธีที่ (2) สามารถใช้ชักนำและคัดเลือกต้นอ่อนที่กลายพันธุ์ได้ เนื่องจากต้นอ่อนพัฒนาผ่านขบวนการโซมาติกอีมบริโอเจเนซิส วิธีที่ (3) ดีกว่าวิธีที่ (2) ตรงที่สามารถเพิ่มการสัมผัสระหว่างกัพพะอ่อนกับสารที่เติม เพื่อการคัดเลือก เป็นการป้องกันไม่ให้เกิดต้นที่ 'escape' ขึ้นได้ ส่วนวิธีที่ (4) เป็นการเปิดโอกาสให้นักปรับปรุงพันธุ์สามารถใช้พันธุกรรมจากถั่วเหลืองได้กว้างขวางยิ่งขึ้น เนื่องจากการผสมระหว่างพ่อแม่ที่เป็นคนละชนิดกัน ผักที่ไ้จะร่วงก่อนที่กัพพะจะแก่ วิธีนี้สามารถช่วยชีวิตกัพพะอ่อนได้ก่อนที่ผักจะร่วง

คำนำ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจัดเป็นเทคนิคพื้นฐานที่นักปรับปรุงพันธุ์พืชสามารถนำมาใช้ร่วมในโครงการปรับปรุงพันธุ์พืชได้อย่างดี Innes (1989) ได้แสดงแนวทางการใช้ประโยชน์จากเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งประกอบด้วย การนำมาใช้เพื่อช่วยขยายพันธุ์พืชที่ดีให้ได้เป็นจำนวนมากและใช้ระยะเวลาสั้น ช่วยในการสร้างพันธุ์พืชปลอดเชื้อโรค ช่วยในการเก็บรักษาแหล่งพันธุกรรมและการเก็บรวบรวมเชื้อพันธุ์ เป็นเทคนิคที่นำมาใช้ช่วยชีวิต

กัพพะลูกผสมที่เกิดจากผสมข้ามระหว่างพ่อแม่ที่ต่างชนิดหรือต่างสกุลกัน ใช้เลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่เชื่อมเข้าด้วยกันเพื่อผสมข้ามระหว่างพืชที่ต่างชนิดหรือต่างสกุล ซึ่งไม่สามารถผสมกันเองตามธรรมชาติ ช่วยในการเพิ่มลักษณะที่มีคุณค่าทางการเกษตร โดยอาศัยความผันแปรทางพันธุกรรมที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อ (somaclonal variation) ใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อในการคัดเลือกหาลักษณะที่จำเพาะเจาะจง (selection aid) เช่น ลักษณะทนเค็ม ทนต่อสภาพเป็นด่าง ทนต่อโรค ใช้ในการสร้างพืชโครโมโซมชุดเดียว (haploid production) เพื่อสร้างพันธุ์แท้ในระยะเวลาอันสั้น และใช้เป็นเทคนิคร่วมในการสร้างพืชทรานสเจนิก (production of transgenic plant)

ในการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองจำเป็นต้องมีเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วเหลืองที่เป็นมาตรฐาน มีประสิทธิภาพในการทำให้เซลล์หรือเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงเกิดการพัฒนาด้านพืชได้ในอัตราที่สูง เนื่องจากถั่วเหลืองเป็นพืชที่จัดไว้ในกลุ่มพืชที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ยากพืชหนึ่ง ประสิทธิภาพในการควบคุมบังคับให้เกิดเป็นต้นพืชยังค่อนข้างต่ำมาก วิธีเพาะเลี้ยงบางวิธียังไม่สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นพืชได้ สิรินุช (2533) และ Moore and Collins (1992) ได้สรุปความก้าวหน้าของเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วเหลืองจากที่มีรายงานไว้ในเอกสารทางวิชาการต่างๆ จากสรุปรายงานแสดงให้เห็นว่า ได้มีการค้นคว้าวิจัยเพื่อปรับปรุงและพัฒนาเทคนิคมาเป็นลำดับโดยนักวิจัยในหลายประเทศ ทำให้โอกาสของการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลือง มีความเป็นไปได้สูงและมีประสิทธิภาพเช่นเดียวกับที่มีรายงานในพืชอื่นๆ

งานวิจัยทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วเหลืองได้เริ่มขึ้นในประเทศในระยะไม่นานนัก โดยนักวิจัยของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ได้รายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วเหลืองโดยการชักนำให้เกิดโซมาติกอีมบริโอเจเนซิส (สิรินุช และวราภรณ์, 2532; สนธิชัย และคณะ, 2533; สิรินุช และคณะ, 2535) ก่อนหน้านั้นได้มีรายงานเกี่ยวกับ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วเหลืองโดยการชักนำให้เกิดแคลลัส แต่ไม่ประสบผลสำเร็จในการเหนี่ยวนำให้เกิดต้นถั่วเหลืองจากการเพาะเลี้ยงผ่านแคลลัส (ประดิษฐ์ และคณะ, 2531)

สำหรับรายงานการวิจัยครั้งนี้ เป็นรายงานเกี่ยวกับเทคนิคและวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วเหลือง ที่ใช้อยู่ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วเหลือง ของภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ และภาควิชาพืชไร่ ภาควิชาเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เป็นเทคนิคที่สามารถนำไปใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองได้ วิธีการเพาะเลี้ยงประกอบด้วยวิธีการสำคัญ 4 วิธี ดังนี้

1. การชักนำให้เกิดยอดหลายยอดโดยการเพาะเลี้ยงคัพพะ
2. การชักนำให้เกิดต้นโดยการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงอ่อนในอาหารที่มี NAA
3. การชักนำให้เกิดต้นโดยการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงอ่อนในอาหารที่มี 2,4-D และการเลี้ยงโซมาติกอิมบริโอในอาหารเหลว
4. การช่วยชีวิตคัพพะ

อุปกรณ์และวิธีการ

การชักนำให้เกิดยอดหลายยอดโดยการเพาะเลี้ยงคัพพะ (zygotic embryo)

เก็บฝักอ่อนของถั่วเหลืองอายุประมาณ 15-30

วัน หลังจากผสมเกสรนำมาล้างด้วยเอทานอล เข้มข้น 95% นาน 15 นาที แกะเมล็ดออกจากฝัก ล้างเมล็ด 2 ครั้ง ด้วยคลอโรกซ์ 5% ครั้งละ 5 นาที ล้างเมล็ดให้สะอาดด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว ใช้น้ำตัดแยกเปลือกหุ้มเมล็ดออก นำคัพพะ (zygotic embryo) ลงเลี้ยงในอาหารสูตร OR (Barwale *et al.*, 1986) เป็นเวลา 30 วัน ตัดส่วนที่เป็นราก และ hypocotyl ออกย้ายกลุ่มของตายยอด และยอดเลี้ยงในอาหารสูตร K (Lamseejan *et al.*, 1989) เพื่อเร่งการเจริญเติบโตของยอด เมื่อยอดมีขนาดยาวอย่างน้อย 2 เซนติเมตร จึงตัดแยกลงเลี้ยงในอาหารสูตร RM (Lamseejan *et al.*, 1989) กลุ่มยอดที่มีขนาดสั้นย้ายลงเลี้ยงต่อในสูตรเดิม เพื่อให้ยอดมีขนาดยาวขึ้น ยอดที่เลี้ยงในอาหารสูตร RM เมื่อเกิดรากสมบูรณ์ ให้ย้ายต้นอ่อนลงเลี้ยงในกระถางที่มีเวอร์มิคูไลท์ เก็บรักษาความชื้นโดยคลุมกระถางด้วยถุงพลาสติกใส หรือใส่กล่องพลาสติกใสจนถั่วเหลืองตั้งตัวได้จึงย้ายลงเลี้ยงในกระถางที่มีดินผสม แล้วนำออกเลี้ยงนอกห้องปฏิบัติการต่อไป

สูตรอาหารต่างๆ ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงคัพพะ เพื่อให้เกิดยอดหลายยอดแสดงไว้ใน Table 1

การชักนำให้เกิดต้นโดยการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงอ่อนในอาหารที่มี NAA

เลือกเก็บฝักอ่อนอายุ 14-15 วัน หลังจากผสมเกสร นำมาล้างแล้วแยกเมล็ดมาทำความสะอาดเพื่อฆ่าเชื้อ โดยขั้นตอนเดียวกันกับข้อ 1 เลือกเฉพาะเมล็ดที่มีขนาด

Table 1 Composition of media used in the experiment on plant regeneration through multiple shoot formation.

Media	Composition
OR	MS major salts + 4X concentration of MS minor elements + B ₅ vitamins + 13.3 µM BAP + 0.2 µM NAA + 5.0 µM thiamine + 12 mM proline + 3% sucrose + 0.75% agar (Barwale <i>et al.</i> , 1986)
K	MS (salts) + B ₅ (vitamins) + 0.05 mg/l BA + 0.005 mg/l NAA + 15% coconut milk + 3% sucrose + 0.75% agar (Lamseejan <i>et al.</i> , 1989)
RM	MS (salts) + B ₅ (vitamins) + 0.01 mg/l 2,4-D + 3% sucrose + 0.75% agar (Lamseejan <i>et al.</i> , 1989)

4-6 มิลลิเมตรมาใช้เพาะเลี้ยง เนื่องจากเป็นระยะที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดไซมาติกเอมบริโอ คัดแยกเฉพาะส่วนของใบเลี้ยง นำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร IM ที่มี NAA เป็นออกซิเจนที่ใช้ในการชักนำให้เกิดไซมาติกเอมบริโอ (สิรินุช และคณะ, 2535) วางใบเลี้ยงลงบนอาหารให้ด้านโค้ง (abaxial) สัมผัสอาหาร เลี้ยงไว้เป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ จะเกิดไซมาติกเอมบริโอขึ้นบริเวณขอบใบ ให้ย้ายไซมาติกเอมบริโลงเลี้ยงในอาหารสูตร MM (Bucheim et al., 1989) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จึงย้ายไซมาติกเอมบริโลงเลี้ยงต่อในอาหารสูตร SH (Schenk and Hildebrandt, 1972) เพื่อให้ไซมาติกเอมบริโอพัฒนาเป็นต้นอ่อนต่อไป

ย้ายไซมาติกเอมบริโลงในอาหารสูตร SH ทุกๆ 30 วัน จนกว่าจะได้ต้นที่สมบูรณ์ เมื่อได้ต้นที่รากสมบูรณ์ ให้ย้ายออกเลี้ยงในกระถางที่มีเวอร์มิคูไลต์ และลงในดินผสมตามลำดับเช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 1

สูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงอ่อนของถั่วเหลือง เพื่อให้เกิดเป็นต้นถั่วเหลืองโดยผ่านไซมาติกเอมบริโอเจนซิส แสดงไว้ใน Table 2

การชักนำให้เกิดต้นโดยการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงอ่อนในอาหารที่มี 2,4-D และการเลี้ยงไซมาติกเอมบริโอในอาหารเหลว

เก็บฝักอ่อนอายุ 14-15 วัน หลังจากผสมเกสร ทำ

ความสะอาดฝักและเมล็ดอ่อนเช่นเดียวกับข้อ 1 เลือกเฉพาะเมล็ดที่มีขนาด 4-6 มิลลิเมตรมาคัดแยกเอาเฉพาะส่วนของใบเลี้ยงอ่อนมาเลี้ยงในอาหารสูตร MX ที่มี 2,4-D เพื่อชักนำให้เกิดไซมาติกเอมบริโอ ความเข้มข้นของ 2,4-D ที่เหมาะสมระหว่าง 20-40 มิลลิกรัม/ลิตร เลี้ยงในอาหารสูตร MX เป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ จะเกิดไซมาติกเอมบริโอบนใบเลี้ยง ย้ายไซมาติกเอมบริโลงเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MF₅ (Finer and Nagasawa, 1988) ที่มี 2,4-D เข้มข้น 5 มิลลิกรัม/ลิตร เปลี่ยนอาหารทุกๆ 2 สัปดาห์เป็นเวลา 3 ครั้ง หลังจากนั้นย้ายไซมาติกเอมบริโอหรือกลุ่มของไซมาติกเอมบริโอที่มีขนาดใหญ่ ลงในอาหารสูตร MM เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และย้ายลงเลี้ยงต่อในอาหารสูตร SH เช่นเดียวกับข้อ 2 เมื่อได้ต้นอ่อนที่มีรากสมบูรณ์จึงย้ายลงเลี้ยงในเวอร์มิคูไลต์ และลงในดินผสมตามลำดับ

สูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงตามข้อ 3 แสดงไว้ใน Table 2

การช่วยชีวิตคัพภะ (embryo rescue)

เก็บฝักอ่อนถั่วเหลืองพันธุ์ปลูกอายุ 9-10 วัน หรือ ถั่วเหลืองพันธุ์ป่า (*Glycin canescens*) กับ *G. tomentella* อายุ 15-20 วัน หลังจากผสมเกสร แยกเมล็ดอ่อนมาล้างด้วยเอทธิแอลกอฮอล์ เข้มข้น 70% นาน 2 วินาที ย้ายเมล็ดลงฟอกฆ่าเชื้อในสารละลายคลอโรกซ์ 10% ซึ่ง

Table 2 Composition of media in the experiment on plant regeneration through somatic embryogenesis.

Media	Composition
IM	MS (salts) + B ₅ (vitamins) + 10-20 mg/l NAA + 3% sucrose + 0.75% agar (สิรินุช และคณะ, 2535)
MX	MS (salts) + B ₅ (vitamins) + 20-40 mg/l 2,4-D + 3% sucrose + 0.75% agar
MM	MS (salts) + B ₅ (vitamins) + 10% sucrose + 0.5% activated charcoal + 0.75% agar (Buchheim et al., 1989)
SH	SH basal medium + 1% sucrose + 0.75% agar (Schenk and Hildebrandt, 1972)
MF ₅	MS (salts) + B ₅ (vitamins) + 5 mg/l 2,4-D + 6% sucrose + 15 mM glutamine (2.192 g/l) (Finer and Nagasawa, 1988)

ได้เติมสารจกใบทวิน 20 จำนวน 3-4 หยดลงไปด้วย ฟอกฆ่าเชื้อเป็นเวลานาน 10 นาที ล้าง 3 ครั้ง ด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว

ตัดแยกคัพพะจากเมล็ดอ่อน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดสองตา (binocular) นำไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร EA ซึ่งประกอบด้วยอาหารสูตร B5 ที่เติม IBA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร (ศศิธร, 2536)

เลี้ยงคัพพะในอาหารสูตรดังกล่าวจนเกิดต้นอ้ว เหลืองที่สมบูรณ์ โดยเปลี่ยนอาหารใหม่ทุกๆ 4 สัปดาห์ เมื่อได้ต้นที่สมบูรณ์แล้ว จึงย้ายลงเลี้ยงในกระถางที่มีส่วนผสมของทราย และขุยมะพร้าวต่อไป

หมายเหตุ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้วเหลือง ตามข้อ 1-4 เป็นการเลี้ยงในหึ่งที่มีอุณหภูมิประมาณ 25 + 2 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่างจากหลอดไฟนีออน หรือ Gro-lux นาน 16 ชั่วโมงต่อวัน อาหารที่ใช้เลี้ยงปรับ pH เป็น 5.08 ก่อนเติมวุ้น

ผลและวิจารณ์

การชักนำให้เกิดยอดหลายยอดโดยการเพาะเลี้ยงคัพพะ

ในการเพาะเลี้ยงคัพพะที่แยกจากเมล็ดอ่อนในอาหารสูตร OR ที่มี EAP และ NAA อยู่ด้วยมีการเจริญของส่วนใบเลี้ยง hypocotyl และส่วนของยอดขึ้นภายในเวลาประมาณ 3-4 สัปดาห์ เมื่อตัดส่วนที่เป็นใบเลี้ยง และ hypocotyl ออก และแยกเฉพาะกลุ่มยอดมาเลี้ยงในอาหารสูตร K ยอดจะมีขนาดยาว และมีใบจริงเกิดขึ้นภายใน 2-3 สัปดาห์ยอดที่มีขนาดยาว เมื่อตัดแยกมาชักนำรากในอาหารสูตร RM จะเกิดรากที่สมบูรณ์ ภายในเวลา 2 สัปดาห์ สำหรับกลุ่มยอดที่มีขนาดเล็ก เมื่อเลี้ยงต่อในอาหารสูตร K สามารถเจริญเติบโตและให้ยอดที่มีขนาดยาวได้อีก ในการย้ายต้นที่มีรากสมบูรณ์ออกจากขวดเลี้ยงลงในเวอร์มิคูไลท์ให้เลี้ยงในสภาพที่มีความชื้นสูงในระยะ 4-5 วันแรกที่อยู่จากขวดเลี้ยง โดยเลี้ยงไว้ในกล่องพลาสติกที่ปิดสนิท หลังจากนั้นจึงค่อยเปิดฝากล่องให้ถั่วเหลืองได้รับอากาศภายนอก ระยะการเลี้ยงช่วงนี้เรียกว่า ระยะ

hardening ซึ่งใช้เวลาประมาณ 10-15 วัน จึงสามารถย้ายลงเลี้ยงในดินผสม และนำออกเลี้ยงนอกห้องปฏิบัติการต่อไปได้ ระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเพื่อให้เกิดต้นสมบูรณ์ และสามารถนำออกเลี้ยงนอกห้องปฏิบัติการได้ใช้เวลาประมาณ 3 เดือน

ต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรุ่นแรกเรียกว่าต้น R1 เมล็ดที่ได้จากต้น R1 เรียกว่าเมล็ด R2 เมื่อนำเมล็ดไปปลูกจะให้ต้น R2 ซึ่งต้นใหม่ที่เกิดขึ้นมีลักษณะตรงตามพันธุ์ จึงเป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้เพื่อช่วยขยายพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์ดีได้ อย่างไรก็ตามวิธีการนี้มีรายงานที่ยืนยันว่าสามารถเกิดความผันแปรทางพันธุกรรม หรือ somaclonal variation ได้เช่นเดียวกัน (Barwale et al., 1986) แสดงว่าสามารถใช้วิธีการชักนำให้เกิดยอดหลายยอดโดยการเพาะเลี้ยงคัพพะ ในการสร้างความแปรปรวนเพื่อปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองได้

นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงการนำเทคนิคนี้ไปใช้ร่วมกับวิธีการทางพันธุวิศวกรรมเพื่อสร้างถั่วเหลืองทรานสเจนิค โดยอาศัยคุณสมบัติที่สามารถเลี้ยง zygotic embryo และ cotyledonary node ให้เกิดยอดและต้นเป็นจำนวนมากได้ในระยะเวลาอันสั้น (Moore and Collins, 1992)

การชักนำให้เกิดต้นโดยการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงอ่อนในอาหารที่มี NAA

ในการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงอ่อนในอาหารที่มี NAA หลังจากเลี้ยงได้ประมาณ 1-2 สัปดาห์ มีการเกิดของโครงสร้าง (structure) สีเขียวใสขึ้นบริเวณขอบใบเลี้ยงโครงสร้างอาจเกิดเดี่ยวๆ แยกจากกัน หรือเกิดโครงสร้างหลายๆ อันติดต่อกันได้โครงสร้างดังกล่าวนี้บางส่วนสามารถนำไปให้เกิดการพัฒนาเป็นต้นถั่วเหลืองได้ บางส่วนกลายเป็นรากหรือเกิดโครงสร้างที่ผิดปกติอื่นๆ ขึ้น แทนที่จะพัฒนาเป็นต้นหรือราก ความเข้มข้นของ NAA ที่ใช้ส่วนใหญ่อยู่ระหว่าง 10-20 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งความเข้มข้นระดับนี้ให้ผลใกล้เคียงกัน (สิรินุช และคณะ, 2535)

เมื่อย้ายโสมมาติกเอ็มบริโอหรือโครงสร้างดังกล่าวมาเลี้ยงต่อในอาหารสูตร MM โสมมาติกเอ็มบริโอขยายใหญ่

ขึ้น สีซีดจางลง จากสีเขียวอ่อนมาเป็นสีเหลือง และสีขาวตามลำดับ ในการย้ายจากอาหารสูตร MM ลงใน SH โชมaticเอ็มบริโอมีการพัฒนาอย่างรวดเร็ว ภายในเวลา 2-3 สัปดาห์ โชมaticเอ็มบริโอบางส่วนของต้นที่สมบูรณ์ ประกอบด้วย hypocotyl ใบเลี้ยง และส่วนยอด รวมทั้งใบจริงเกิดขึ้นด้วย บางส่วนจัดเป็นพวกผิดปกติ เช่น มีแต่ hypocotyl และใบเลี้ยง ไม่มีส่วนของยอดเกิดขึ้น หรือบางส่วนเกิดการพัฒนารากแต่เพียงอย่างเดียว (Figures 1-5)

ในการชักนำด้วย NAA โชมaticเอ็มบริโอเกิดขึ้นจากเซลล์ได้ผิวใบโดยตรงโดยผ่านแคลลัส จัดการเป็นการพัฒนาแบบ direct embryogenesis ส่วนใหญ่เกิดจากเซลล์เดี่ยว (single cell) และมีรายงานยืนยันว่า มีการเกิดความผันแปรทางพันธุกรรมขึ้นได้จากการเพาะเลี้ยงผ่านขบวนการเอ็มบริโอเจเนซิส (Barwale et al., 1986)

การชักนำให้เกิดต้นโดยการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงอ่อนในอาหารที่มี 2,4-D และการเลี้ยงโชมaticเอ็มบริโอในอาหารเหลว

ในการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงอ่อนในอาหารที่มี 2,4-D ในระยะแรกใบเลี้ยงเปลี่ยนจากสีเขียวอ่อนเป็นสีเหลือง และสีน้ำตาลตามลำดับ ต่อมาโครงสร้างสีเหลืองอ่อนเกิดขึ้นพร้อมๆ กับการเกิดแคลลัส โครงสร้างดังกล่าวมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น บางส่วนมีลักษณะเป็น globular และเกิดซ้อนบนโครงสร้างเดิมได้ เรียกทั้งกลุ่มนี้ว่าเอ็มบริโอ-เจนิกแคลลัส (embryogenic callus) มีสีเขียวอ่อนจนถึงสีเหลือง เมื่อย้ายเอ็มบริโอเจนิกแคลลัสลงเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MF6 และเลี้ยงบนเครื่องเขย่า (shaker) เอ็มบริโอเจนิกแคลลัสสามารถเพิ่มปริมาณและขนาดได้ บางส่วนหลุดออกมาเป็นโชมaticเอ็มบริโอที่มีโครงสร้างเดี่ยวๆ การเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MF6 จะช่วยเพิ่มปริมาณและขนาดของโชมaticเอ็มบริโอสามารถเลี้ยงเพิ่มจำนวนโชมaticเอ็มบริโอได้ระยะหนึ่ง โดยย้ายลงอาหารใหม่ ทุก 4 สัปดาห์ เลี้ยงติดต่อกันในอาหารเหลวได้ไม่เกิน 5-6 เดือน ถ้ามากกว่านั้นทำให้โชมaticเอ็มบริโอเปลี่ยนเป็นสี

น้ำตาล ไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ และตายไปในที่สุด

ในการเพาะเลี้ยงโดยใช้ 2,4-D ชักนำให้เกิดโชมaticเอ็มบริโอ เป็นวิธีการที่ประสิทธิภาพกว่าการใช้ NAA ทั้งนี้เพราะสามารถชักนำให้เกิดโชมaticเอ็มบริโอได้เป็นจำนวนมาก และสามารถเพิ่มจำนวนได้โดยการย้ายเอ็มบริโอเจนิกแคลลัสลงเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MF6 การเลี้ยงในอาหารสูตร MF6 ทำให้โชมaticเอ็มบริโอส่วนใหญ่อยู่ในโครงสร้างที่เป็น globular ได้นานถึง 5-6 เดือน และโดยคุณสมบัติข้อนี้สามารถนำมาใช้ในการคัดเลือกหาลักษณะที่เป็นประโยชน์ทางการเกษตรได้ เช่น ลักษณะทนเค็ม ทนกรด ทนต่อสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช ฯลฯ โดยหอดูดังกล่าวในอาหาร MF6 โชมaticเอ็มบริโอมีการสัมผัสกับสารที่ใช้ในการคัดเลือกได้โดยตรง จึงสามารถเลือกคัดหาลักษณะที่กลายพันธุ์ได้ง่าย นอกจากนี้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยผ่านการเกิดแคลลัส ทำให้ต้นพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมีความผันแปรทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง เป็นโอกาสให้นักปรับปรุงพันธุ์ได้คัดเลือกหาลักษณะที่มีคุณค่าทางการเกษตร มาใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองได้มากกว่าวิธีเพาะเลี้ยงในข้อ 1 และ 2

มีรายงานการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงผ่านโชมaticเอ็มบริโอ มาประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคนิคการถ่ายยีน โดยใช้ biolistic บิงพลาสมิกที่มียีนที่ต้องการเข้าไปยังเอ็มบริโอเจนิกแคลลัสของถั่วเหลือง จากนั้นนำเอ็มบริโอเจนิกแคลลัสมาเลี้ยงในอาหารช่วยการคัดเลือก (selective medium) เพื่อแยกโชมaticเอ็มบริโอที่มียีนที่ต้องการ (transformed หรือ transgenic embryos) ออกจากโชมaticบริโอปกติ (nontransformed) จากนั้นจึงนำทรานสเจนิกเอ็มบริโอมาเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดเป็นต้นพืชทรานสเจนิก (Moore and Collins, 1992) จากตัวอย่างนี้ได้แสดงให้เห็นถึงแนวทางการนำเทคนิคจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ประโยชน์ ร่วมกับเทคนิคทางชีวโมเลกุลเพื่อสร้างพืชพันธุ์ใหม่ๆ ที่มีลักษณะตามต้องการ

การช่วยชีวิตคัพพะ

ในการแยกคัพพะของถั่วเหลืองมาเลี้ยงในอาหาร

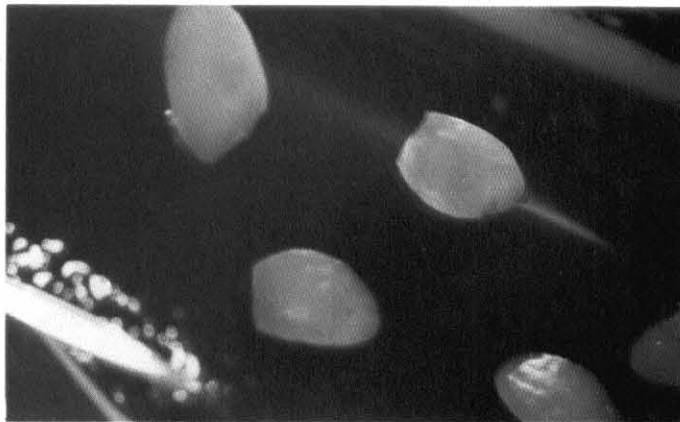


Figure 1 Immature cotyledons cultured on the induction medium containing NAA.

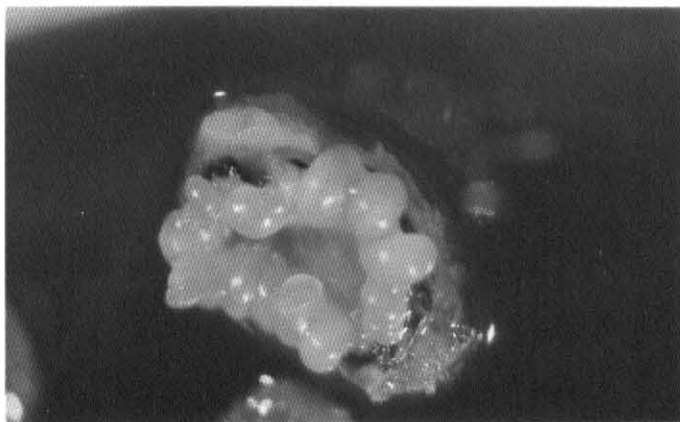


Figure 2 Somatic embryos produced on immature cotyledon.



Figure 3 Somatic embryos on the MM medium.



Figure 4 Somatic embryos at higher magnification.

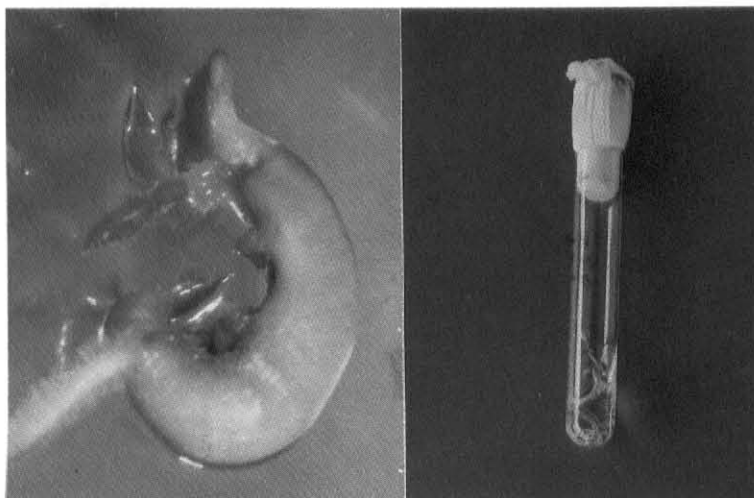


Figure 5 Germination of somatic embryo on the SH medim.

EA (ศศิธร, 2536) พบว่า ได้ค้นหามีรากสมบูรณ์พร้อมด้วยใบเลี้ยงจริงคู่แรกและใบประกอบคู่แรก ภายในระยะเวลา 2 เดือนพร้อมที่จะย้ายออกจากขวดได้ ปัญหาที่พบคือ ถ้าคัพภะมีขนาดเล็กเกินไปจะไม่สามารถแยกออกจากเมล็ดได้ โดยเฉพาะคัพภะของถั่วเหลืองพันธุ์ป่า เมื่อเพาะเลี้ยงทั้งเมล็ดโดยไม่แยกคัพภะออกมักทำให้เกิดแคลลัส และเป็นอุปสรรคต่อการงอกของคัพภะ คัพภะจากเมล็ดพันธุ์ปลูกอายุ 9-10 วัน เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงมีอัตราการงอกในขวดได้

ในขณะการทดลองเพาะเลี้ยงคัพภะของถั่วเหลืองพันธุ์ปลูกต่างๆ ก่อนข้างให้ผลดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเลี้ยงคัพภะของถั่วเหลืองพันธุ์ที่มีเมล็ดขนาดใหญ่ เช่น พันธุ์สุวรรณ 1 และถั่วเหลืองฝักสดต่างๆ แต่สำหรับคัพภะลูกผสมที่ได้จากการผสมข้ามระหว่างพันธุ์ปลูกกับพันธุ์ป่า (*G. tomentella*) ยังไม่สามารถนำมาเลี้ยงเพื่อช่วยชีวิตได้ ทั้งนี้เพราะฝักที่ได้รับการผสมพันธุ์แล้วนั้น จะหลุดร่วงเร็วเกินไปโดยที่คัพภะลูกผสมยังอ่อนอยู่มาก ไม่สามารถแยกมาเลี้ยงเพื่อช่วยชีวิตให้รอดได้ ปัญหาและอุปสรรคของการเพาะเลี้ยงคัพภะลูกผสมจำเป็นต้องมีการศึกษางานวิจัยเพื่อหาทางแก้ไขปัญหาดังกล่าว

สรุป

จากการพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วเหลืองขึ้นในประเทศไทย ขณะนี้ได้มีเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 4 วิธี ที่สามารถนำมาใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองได้ วิธีการเพาะเลี้ยงประกอบด้วย (1) การชักนำให้เกิดยอดหลายยอดโดยการเพาะเลี้ยงคัพภะ (2) การชักนำให้เกิดต้นถั่วเหลืองโดยใช้ NAA ชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจนนิซ (3) การเลี้ยงให้เกิดต้นถั่วเหลืองโดยใช้ 2,4-D ชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจนนิซ และย้ายไปเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อเพิ่มจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ (4) การเพาะเลี้ยงเพื่อช่วยชีวิตคัพภะ จากการเพาะเลี้ยงทั้ง 4 วิธี สามารถนำมาใช้เพื่อประสงค์ต่างๆ กัน ได้แก่ การใช้เพื่อขยายพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์ที่ได้เป็นจำนวนมากและใน

ระยะเวลาอันสั้นใช้เพื่อสร้างความผันแปรทางพันธุกรรมให้เกิดขึ้น และนักปรับปรุงพันธุ์พืชสามารถเลือกลักษณะดีมีประโยชน์มาใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองได้ ส่วนเทคนิคการเพาะเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอในอาหารเหลวสามารถนำมาใช้เพื่อคัดเลือกลักษณะที่จำเพาะเจาะจง เช่น ลักษณะทนเค็ม ทนกรด เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

- ประดิษฐ์ พงศ์ทอง, สมศักดิ์ อภิสิทธิ์วานิช, ยุพา มงคลสุข, รัชนิ จำปาเทศ, พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์ และเผด็จ ระเบิดสุนทร. 2531 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วเหลือง ตอนที่ 1. การประชุมทางวิชาการ ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 28 3-5 กุมภาพันธ์ 2531. หน้า 234.
- ศศิธร เชื้ออุณะ. 2536. การเพาะเลี้ยงคัพภะของถั่วเหลืองบางชนิด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาพืชไร่ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 624 หน้า.
- สนธิชัย จันทน์เปรม, รัชนิ ธีระพจนารณ และ พีระศักดิ์ ศรีนิเวศ. 2533. การเกิดเอ็มบริอยด์และเกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงอ่อนของถั่วเหลือง ว.เกษตรศาสตร์ (วทย). 24 : 332-338.
- สิรินุช ลามศรีจันทร์ และวรภรณ์ โรจนศิริวงศ์. 2532. การเกิดต้นถั่วเหลืองในพันธุ์ค้อยคำจากโซมาติกเอ็มบริโอเจนนิซ. ว.เกษตร (วทย.) 22(4) : 248-255.
- สิรินุช ลามศรีจันทร์. 2533. การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อปรับปรุงพันธุ์ถั่วเขียวและถั่วเหลือง. เอกสารประกอบการบรรยายพิเศษในการสัมมนา เพื่อรายงานความก้าวหน้าของงานวิจัยในโครงการแม่บทที่ 1 เพื่อพัฒนาพืชโปรตีนสูง 8-9 มกราคม 2533. ณ ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. 17 หน้า.
- สิรินุช ลามศรีจันทร์, อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์ และสุมินทร์

- สมุทคุปดี. 2535. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วเหลือง
ในสภาพแขวนลอย. ว.เกษตรศาสตร์ (วิทย.) 26 :
151-157.
- Barwale, U.B., H.R. Kerns and J.M. Widholm. 1986.
Plant regeneration from callus cultures of
several soybean genotypes via embryo-gen-
esis and organogenesis. *Planta*. 67 : 473-486.
- Buchheim, J.A., S.M. Colburn and J.P. Ranch. 1989.
Maturation of soybean somatic embryos and
the transition to plantlet growth. *Plant
physio*. 89 : 768-775.
- Finer, J.J. and A. Nagasawa. 1988. Development of
embryogenic suspension culture of soybean
(*Glycine max* Merrill). *Plant Cell, Tissue and
Organ Culture*. 15 : 125-136.
- Gamborg, O.L., R.A. Miller and K. Ojima. 1968.
Nutrient requirements of suspension culture
of soybean root cells. *Exp. Cell Res*. 50 :
151-158.
- Innes, N.L. 1989. Biotechnology and plant breeding.
AgBiotech News and Information Vol. 1(1) :
27-32.
- Lamseejan, S., T. Thonguthaisri, A. Wongpiyasatid,
S. Unsrisong, S. Kumphai and N.
Jonglackha. 1989. Dry bean (*Phaseolus
vulgaris*) improvement through mutation
breeding and tissue culture technique. STDB
Semi-Annual Report No. 2 p. 12.
- Moore, P.J. and G.B. Collins. 1992. Transformation
in soybean (*Glycine max* L.) ในเอกสาร
ประกอบการประชุมสัมมนาเชิงปฏิบัติการ เรื่อง
"Gene Transfer Technology" จัดโดยคณะวิทยา
ศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วันที่ 22-26
มิถุนายน 2535 หน้า 71-99. ISBN 974-553-021-2.
- Murachige, T. and F.A. Skoog. 1962. A revised me-
dium for rapid growth and bioassays with to-
bacco tissue culture. *Physiologia Pl.* 15 : 473-
497.
- Schenk, R.V. and A.C. Hildebrandt. 1972. Medium
and techniques for induction and growth of
monocotyledonous and dicotyledonous plant
cell culture. *Can. J. Bot.* 50 : 199-204.